

• 实验研究 •

益气活血方和补肾生髓方对脑缺血再灌注大鼠海马和额顶叶皮质 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达的影响*

徐 伟¹, 王丽娜², 王 键^{2△}, 胡建鹏², 何 玲², 谭 辉², 王元茂¹

(1. 安徽中医药大学医药信息工程学院, 安徽 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学省部共建新安医学教育部重点实验室, 安徽 安徽 230038)

摘要: **目的** 观察两种中药复方对脑缺血再灌注大鼠海马和额顶叶皮质 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达的影响,探讨其作用机制。**方法** 0.26mm 尼龙线,造成大鼠右侧大脑中动脉阻塞,采用随机分组法,分入假手术组、模型组、益气活血方组和补肾生髓方组。脑缺血 2h 后,分别于再灌注 7d 和 14d 取缺血侧海马和皮质。采用 Western Blot 检测海马和额顶叶皮质 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白 7d 和 14d 表达均显著上调($P<0.05$);与模型组比较,益气活血方组和补肾生髓方组 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白 7d 和 14d 表达均显著下调($P<0.05$);与补肾生髓方组比较,益气活血方组 Jagged1、Notch4 蛋白 7d 和 14d 表达均显著下调($P<0.05$)。**结论** 益气活血方和补肾生髓方能通过下调 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达,调节 Notch 信号通路,影响脑缺血后内源性神经干细胞增殖分化,促进其向神经元分化。

关键词: 益气活血方; 补肾生髓方; 脑缺血再灌注; Jagged1; Notch4; Hes1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)06-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.001

缺血性卒中是临床常见病和多发病,研究发现脑缺血后室管膜、齿状回颗粒下层出现神经干细胞增殖,这些增殖神经干细胞向缺血区迁移、分化,试图补偿丢失的细胞,重塑受损的神经组织^[1]。

Notch 信号通路在 SVZ/LV 及 SGZ/DG 的神经再生,以及神经干细胞的维持和分化中起重要作用^[2]。本研究通过单侧大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,通过益气活血法和补肾生髓法对局灶性脑缺血大鼠模型的治疗,对 Notch 通路 Jagged1、Notch4、Hes1 蛋白进行检测,观察益气活血方和补肾生髓方疗效,找出 Jagged1、Notch4 和 Hes1 的相关作用和调控机制,进一步了解 Notch 信号通路在脑缺血性损伤中的作用。

1 材料

1.1 实验动物和实验药物

健康 SD 雄性大鼠 40 只(定远永康青源动物中心

提供,许可证号 SCXK(皖)2011-002),清洁级,4 月龄,体质量 280~320g,在安徽中医药大学省部共建新安医学教育部重点实验室饲养。益气活血方和补肾生髓方均由安徽中医药大学中药制剂室提供,相当于原生药 1.0、2.4 g·mL⁻¹,两方取中等剂量,分别以 8.54、12.87 g·kg⁻¹ 给大鼠灌胃^[3]。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:RIPA 细胞裂解液(强)(碧云天生物技术有限公司,货号:P0013B)、SDS (sigma,批号:CAS:151-21-3)、ECL 超敏发光试剂盒(Thermo,批号:QE218149)、beta-Actin(北京中杉)、山羊抗小鼠 IgG(北京中杉,批号:109145)、兔抗山羊 IgG(北京中杉,批号:109525)、Jagged1(bioss)、Notch4(bioss)、Hes1(bioss)。

主要仪器:EPS 300 型电泳仪、VE-180 型电泳槽、VE-186 型转膜仪、垂直板电泳槽(Tanon),PVDF 膜(Millipore),X 胶片(Kodak)。

* 基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAI26B01);国家自然科学基金(30973692);国家青年科学基金(81603523);安徽中医药大学自然科学研究项目(2015zr015)

收稿日期: 2017-10-26

作者简介: 徐伟(1989-),男,安徽蚌埠人,硕士,讲师,研究方向:中医治则治法的理论与实验研究。

△通信作者: 王键,E-mail:wangjian6301@163.com

2 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型制作与评定

方法参照文献[4], 0.26mm 尼龙线, 造成大鼠右侧大脑中动脉阻塞, 脑缺血 2h 再灌注时对模型鼠进行评分。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 向对侧转圈; 3 分: 向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失, 2~3 分纳入成功模型^[5-6]。

2.2 分组与给药

SD 大鼠采用随机分组法, 分入假手术组、模型组、益气活血方组和补肾生髓方组。两方药组, 在造成局灶性脑缺血前 30min 分别称体重, 按 8.54 、 $12.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药 1 次, 以后 2 次/d, 灌胃。假手术组和模型组予以等量生理盐水灌胃, 方法同上。

2.3 取材

大鼠给药 7d 和 14d, 10%水合氯醛麻醉 ($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$, ip), 迅速取出整脑, 置于 0.9%冰冻生理盐水中, 分离海马和额顶叶皮质, -80°C 冰箱储存备用。

2.4 Western Blot 检测

组织称重, 取 100mg 左右, 裂解、离心, 收集上清液样品, 加入蛋白上样缓冲液。水浴加热 10min。冷却样品至室温, 将其上样至加样孔内, 每孔加入 $15 \mu\text{L}$ 样品, 压电, 进行浓缩与分离, 然后转膜, 结束后置于 Western 洗涤液中漂洗 5 min, 室温封闭 2h。按照一抗说明书操作, Jagged1 抗体属性为兔抗 1:200 稀释; Notch4 抗体属性为兔抗 1:200 稀释; Hes1 抗体属性为兔抗 1:200 稀释; 6%, 8%, 10%分离胶。4℃缓慢摇动孵育过夜。洗涤液 (TBST) 洗涤 3 次, 10min/次。然后按照二抗说明书操作, 二抗稀释液以 (1:10 000) 稀释二抗 (HRP 标记)。封闭 2h (室温)。洗涤液 (TBST) 洗涤 3 次, 10min/次。使用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白。

2.5 统计学方法

以相对灰度值进行统计学分析。数据以 Jagged1/ β -actin、Notch4/ β -actin、Hes1/ β -actin 表示。数据经 SPSS17.0 处理。结果用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析法, 比较组间均数差异, 两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 则认为组间差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两方对脑缺血再灌注模型鼠海马区的影响

与假手术组比较, 模型组海马区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 益气活血方和补肾生髓方组海马区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$); 与补肾生髓方组比较, 益气活血方 7d 组海马区 Jagged1、Notch4 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$), 14d 组 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达均显著减少 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

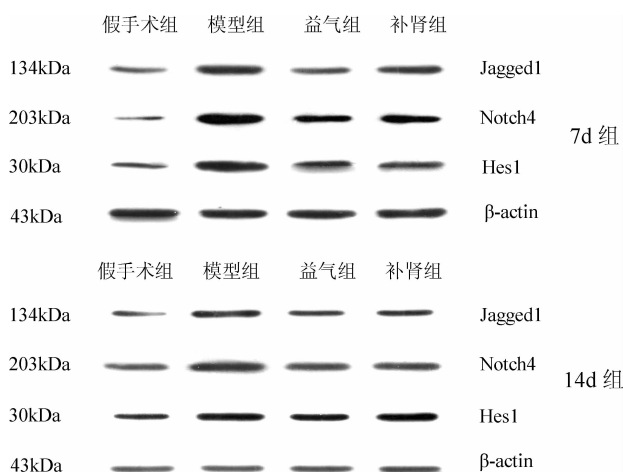


图 1 SD 大鼠海马区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白相对表达量

表 1 SD 大鼠海马区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	Jagged1		Notch4		Hes1	
	7d	14d	7d	14d	7d	14d
假手术组	0.311 ± 0.025	0.268 ± 0.028	0.269 ± 0.038	0.191 ± 0.035	0.201 ± 0.011	0.151 ± 0.014
模型组	$0.871 \pm 0.032^*$	$0.679 \pm 0.086^*$	$1.065 \pm 0.051^*$	$1.061 \pm 0.06^*$	$0.550 \pm 0.055^*$	$0.772 \pm 0.062^*$
益气活血方组	$0.413 \pm 0.045^{\# \Delta}$	$0.414 \pm 0.025^{\# \Delta}$	$0.528 \pm 0.049^{\# \Delta}$	$0.713 \pm 0.061^{\# \Delta}$	$0.300 \pm 0.045^{\#}$	$0.476 \pm 0.03^{\# \Delta}$
补肾生髓方组	$0.527 \pm 0.079^{\#}$	$0.520 \pm 0.06^{\#}$	$0.690 \pm 0.026^{\#}$	$0.846 \pm 0.059^{\#}$	$0.360 \pm 0.066^{\#}$	$0.551 \pm 0.015^{\#}$
F	72.569	28.964	187.534	137.614	27.22	151.694
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与假手术组比较, $^*P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与补肾生髓方组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

3.2 两方对脑缺血再灌注模型鼠额顶叶皮质区的影响

与假手术组比较,模型组额顶叶皮质区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著增加($P<0.05$);与模型组比较,益气活血方和补肾生髓方组额顶叶皮质区

Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著减少($P<0.05$);与补肾生髓方组比较,益气活血方组额顶叶皮质区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著减少($P<0.05$)。见图 2、表 2。

表 2 SD 大鼠额顶叶皮质区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Jagged1		Notch4		Hes1	
	7d	14d	7d	14d	7d	14d
假手术组	0.256±0.043	0.421±0.098	0.374±0.049	0.289±0.062	0.462±0.073	0.223±0.011
模型组	1.343±0.055*	1.235±0.033*	1.711±0.09*	1.187±0.07*	1.433±0.086*	1.075±0.051*
益气活血方组	0.689±0.058 ^{#△}	0.841±0.016 ^{#△}	0.533±0.038 ^{#△}	0.778±0.117 ^{#△}	0.870±0.069 ^{#△}	0.745±0.06 ^{#△}
补肾生髓方组	0.858±0.044 [#]	0.961±0.031 [#]	0.770±0.087 [#]	0.931±0.12 [#]	1.077±0.111 [#]	0.851±0.059 [#]
<i>F</i>	239.946	116.12	219.131	46.437	66.156	159.472
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与补肾生髓方组比较,[△] $P<0.05$

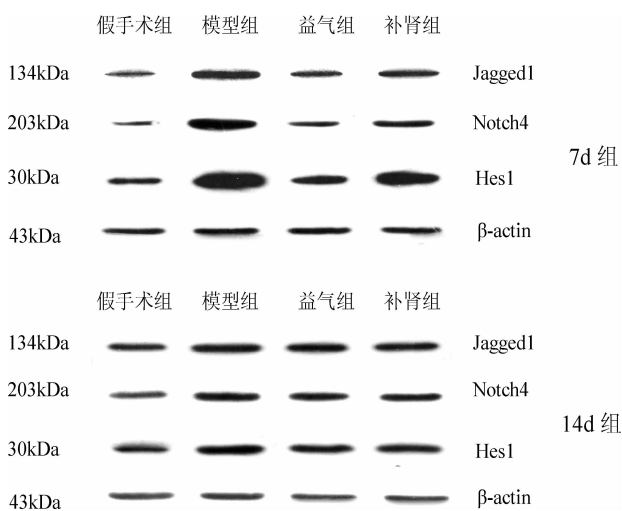


图 2 SD 大鼠额顶叶皮质区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白相对表达量

4 讨论

益气活血方和补肾生髓方是新安医家临床防治缺血性卒中的经验方,前期实验研究发现:脑缺血后出现神经干细胞增殖,并向缺血区迁移、分化;益气活血方和补肾生髓方能使皮质缺血半暗带神经特异性蛋白 GAP-43 表达明显增强,促进缺血性卒中恢复期模型大鼠神经轴突再生,促进神经功能恢复^[7-9];益气活血方和补肾生髓方还能显著促进皮质区 Nestin 蛋白的表达,进而促进缺血后大鼠脑内和体外培养胎鼠 NSCs 的增殖分化^[10]。

Notch 信号通路高度保守,其在神经调控过程中,

决定了 NSCs 增殖与分化的方向^[11-12]。Notch 配体在哺乳动物中叫做 Jagged^[13]。Notch 受体分子量约 300KD,人类有 4 个同源基因 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4^[14]。Notch 信号的靶分子多为碱性螺旋-环-螺旋类转录因子,它们对哺乳动物中的 Hes 等与细胞分化直接相关的基因,也具有转录调节作用^[15]。研究发现 Jagged1 能抑制小鼠胚胎脑神经干细胞向神经元分化,细胞增殖越快,Jagged1 表达水平越高^[16-17];大鼠脑缺血再灌注 24h 时海马 Notch4mRNA 和 NICD 蛋白表达上调^[18];NICD 调控 Hes1 表达,促进缺血周围区皮质以及缺血侧 SVZ 区内源性神经干细胞的增殖^[19];大鼠局灶性脑缺血 19d 海马 Hes1 蛋白表达高于假手术组,28d 海马 Hes1 蛋白表达显著下调,有利于促进增殖的神经前体细胞向神经元方向分化^[20]。

本实验研究发现局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血侧海马区和额顶叶皮质区 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达显著升高,提示局灶性脑缺血再灌注存在 Notch 信号通路被激活,益气活血方和补肾生髓方能降低 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达。因此认为两种中药复方能通过抑制 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达,对 Notch 信号通路进行调控,进而影响脑缺血再灌注后 NSCs 增殖分化,促进其向神经元分化。益气活血方组与补肾生髓方组在降低 Jagged1、Notch4 和 Hes1 蛋白表达方面也有差异,在 7d 和 14d 两个节点上,益气活血方的效果均优于补肾生髓方,其具体的分子作用机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 高小青,李雷激,陈波,等. 脑缺血再灌注诱导内源性神经干细胞的增殖、分化[J]. 中风与神经疾病杂志, 2009, 26(5): 541-544.
- [2] 沈建英,林玲,郑志斌. Notch 信号通路在脑生发区神经干细胞维持与神经再生中的作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(4): 588-593.
- [3] 宋祖荣,王键,胡建鹏,等. 益气活血方和补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 Wnt3a、Frizzled9 和 TCF3 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(3): 190-194.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] 孙念霞,高维娟,易忠良. 改良线栓法制作 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2): 225-230.
- [6] 陈晓娟,肖宗宇,潘琪,等. 改良线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立[J]. 中国医学创新, 2015, 12(3): 24-27.
- [7] 何玲,王键. 新安医家验方脑络欣通改善缺血性中风作用机制研究的思路与方法[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1921-1925.
- [8] 江爱娟,胡建鹏,王键,等. 益气活血方和补肾生髓方对大鼠脑缺血恢复期 GAP-43 和 SYP 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(6): 418-419.
- [9] 吕磊,胡建鹏,王键,等. 益气活血方和补肾生髓方对脑缺血再灌注大鼠 Notch3 和 Frizzled2 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(7): 1171-1174.
- [10] 宋祖荣,徐伟,王键,等. 补肾生髓方和益气活血方对局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮质 Notch 信号通路 Nurr1、SMO mRNA 及其蛋白表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 57-60.
- [11] 汪宏锦,李晶晶,柯慧,等. 中药对神经干细胞增殖分化信号通路的综合调控作用分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4093-4103.
- [12] 居相春,侯琼琼,肖琪,等. 大脑皮层在发育和进化中增大及沟回形成的分子细胞机制[J]. 生理学报, 2017, 69(4): 485-497.
- [13] 甘志华,陈钰. Notch 信号通路和多发性骨髓瘤[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(5): 1380-1383.
- [14] 朱钦士. DNA 与个体发育调控(2)[J]. 生物学通报, 2015, 50(9): 16-20.
- [15] 隋毓秀,张志琚,郭怡菁,等. 氟西汀对神经干细胞增殖和 Notch1 信号通路相关蛋白表达的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(9): 1227-1230.
- [16] 樊拥军,崔筱英,吴树亮,等. Jagged1 蛋白抑制神经干细胞向神经元分化的实验[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(2): 124-126.
- [17] 刘柏炎,俞悦,易健,等. 黄芪甲苷和齐墩果酸对体外神经干细胞增殖和 Jagged1 mRNA 表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1033-1036.
- [18] 陈丽,叶军明,彭道珍,等. 脑缺血预处理中大鼠海马 Notch 信号通路的变化[J]. 赣南医学院学报, 2012, 32(1): 10-12.
- [19] 陶静,柳维林,黄佳,等. 基于 Notch1 信号通路观察电针对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血周边皮质与 SVZ 区神经干细胞增殖的影响[J]. 康复学报, 2015, 25(3): 23-34.
- [20] 郭怡菁,张志琚,王少华,等. 缺血性卒中大鼠海马的 Notch 信号通路功能的动态变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(6): 346-349.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 13 页)

Effect of Astragalus Polysaccharide Combined with Radiotherapy on Radiosensitivity and Immune Function of Transplanted Tumor in Mice

LYU Xinming, XU Jinfen, YAN Chengxin, XUE Dixin, SUN Yaoyao
(Lai-Gang Hospital Affiliated to Taishan Medical College, Laiwu 271126, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the effects of astragalus polysaccharide combined with radiotherapy on radiosensitization of H22 transplanted hepatocarcinoma and immunologic function in mice. **Methods** Establishment of mouse H22 transplanted tumor model, 50 mice were divided into A group (control group), B group (chemotherapy group), group C (low dose of Astragalus Polysaccharides combined with chemotherapy group), group D (middle dose chemotherapy group), E group (Gao Jiliang chemotherapy group), the growth situation and change observation on the immune function of tumor mice. **Results** With the increase of drug concentration combined with astragalus polysaccharide, TGT₃, TGD and EF values were increased; treatment of 14d, the tumor weight of mice in treatment group were lower than A group and E group, and lower than the other groups, with the increase of drug concentration of Astragalus, the inhibition rate is higher; the average survival period of all treatment groups were longer than that of group A, and with the increase of drug combined with astragalus; the index of immune function in mice in each treatment group were lower than those in A group, and the combined use of Astragalus polysaccharide. **Conclusion** Astragalus polysaccharide combined with radiotherapy has radiosensitizing effect, can inhibit tumor growth, prolong the survival time of mice with transplanted tumor and increase the immunological function of mice.

KEY WORDS: astragalus polysaccharide; radiosensitivity; hepatocellular carcinoma; immunological function; mouse

(原文见第 1 页)

Influences of Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion on Related Proteins in Rats with Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion

XU Wei¹, WANG Lina², WANG Jian², HU Jianpeng², HE Ling², TAN Hui², WANG Yuanmao¹
(1. Medical Information Engineering Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;
2. Key Laboratory of Xin'an Medicine Jointly Developed by Ministry of Education and Anhui Province, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the influences of Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion on protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex of rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion was established by using suture method for inducing middle cerebral artery occlusion (MCAO), the rats were randomly divided into sham group, model group, Yiqi Huoxue Decotion group (Y group) and Bushen Shengsui Decotion group (B group). After ischemia for 2h and reperfusion, The hippocampus and frontal cortex of ischemic side were taken tissue samples in 7d and 14d. The protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex were detected by using Western Blot. **Results** The value of Jagged1、Notch4 and Hes1 protein expressions in model group were higher than that in sham group in 7d and 14d ($P<0.05$), the value of Jagged1、Notch4 and Hes1 protein expressions in Y group and B group were lower than that in model group in 7d and 14d ($P<0.05$), the value of Jagged1、Notch4 protein expressions are significant difference between Y group and B group in 7d and 14d ($P<0.05$). **Conclusion** Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion can regulate the Notch signaling pathway, affect the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells after cerebral ischemia, make them differentiated into neurons more through reducing protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex.

KEY WORDS: Yiqi Huoxue Decotion; Bushen Shengsui Decotion; Cerebral ischemia/reperfusion; Jagged1; Notch4; Hes1